Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen
Vorstand Prof. Dr. Wolf

Beziehungen zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien (Impfstoffen).

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde
eines Doktors der Zahnheilkunde verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen vorgelegt

von

Ernst Müller
Zahnarzt
aus Stuttgart

Druck der Buchdruckerei Eugen Göbel, Tübingen
1932

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät.

Dekan: Prof. Dr. H a f f n e r.

Referent: Prof. Dr. W o l f.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

In den vorliegenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob und welche Wirkungen sich beim Zusammenbringen lebender und abgetöteter Bakterien (Impfsoffen) beobachten lassen. Die Wirkungen wurden festgestellt durch Zählung der lebenden Keime zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Zusammenbringen mit den Impfstoffen.

Man erklärt bekanntlich den therapeutischen Effekt der Impfstoffbehandlung gewisser Infektionskrankheiten durch die Annahme, der Körper bilde, angeregt durch die Impfstoffe, Schutz- oder Abwehrstoffe, die auf die Infektionserreger eine vermehrungshemmende oder vernichtende Wirkung ausüben.

Im Folgenden sei zunächst kurz auf die Theorie der Immunität und Antikörperbildung eingegangen, wobei ich im Wesentlichen den Ausführungen von W. Kolle und R. Prigge folge (1).

Die erworbene individuelle Immunität ist ein Zustand, der im Laufe des Lebens durch Überstehen einer spontanen Infektion (Krankheit) oder durch eine Schutzimpfung entsteht. Als Grundgesetz kann aufgestellt werden: eine echte spezifische Immunität eines Individuums, das einer, für die entsprechende spezifische Infektion empfänglichen Rasse angehört, wird nur durch Überstehen dieser Infektion oder durch eine spezifische künstliche Immunisierung erworben.

Schon kurz nach den ersten Erfolgen auf dem neuerschlossenen Gebiete der experimentellen Immunitätsforschung wurde durch Ausarbeitung der verschiedensten Theorien versucht, in das Wesen der erworbenen Immunität einzudringen. Diese Theorien sollten dann heuristisch weiter verwandt werden. Die heute von der Mehrzahl aller Immunitätsforscher als die heuristisch wertvollste und für die Erklärung fast aller Tatsachen als ausreichend anerkannte Theorie von Ehrlich soll hier kurz dargelegt werden.

Durch Behrings Entdeckung spezifischer Stoffe im Blutserum immuner Individuen wurde das Problem der erworbenen aktiven Im-

munität seiner Lösung wesentlich näher gebracht. Im Tier- und Menschenkörper entstehen durch die Einverleibung der zugehörigen Antigene (d. h. Antikörper erzeugende Stoffe) Stoffe, die als Schutzstoffe, Immunstoffe, Antikörper im allgemeinen, als spezifische Antitoxine, Bakteriolysine und Bakteriotropine im Besonderen bezeichnet werden. Wenn wir die Ehrlichsche Seitenkettentheorie als Grundlage der theoretischen Vorstellungen nehmen, verdanken diese Antikörper ihre Entstehung einer Reaktion des Organismus: Für die Zellen werden diejenigen normalen Bestandteile an die sich die Antigene (Toxine, Bakterien) verankern, das sind die Rezeptoren oder Seitenketten, wertlos. Nach den Vorstellungen Weigerts wird jeder Gewebsdefekt nicht nur eben gedeckt, sondern übermäßig ersetzt. Da also eine „Hyperregeneration" stattfindet, werden die Rezeptoren im Übermaß ersetzt. Die überschüssig gebildeten Rezeptoren werden ins Blut abgestoßen und stellen dort die Antikörper dar. Im Blut immuner Individuen sind also freie Rezeptoren vorhanden, die wie die Seitenketten der Zellen Antigene zu binden imstande sind. Der Ausdruck „Seitenketten" ist im Sinne der Chemie zu verstehen; die Antigene werden an Seitenketten von Molekülen des Zollprotoplasmas angelagert, wie sich die Reaktionen der aromatischen Verbindungen an den Seitenketten des Benzolkerns abspielen.

Die Schutzstoffe sind nicht nur ein Ausdruck der eingetretenen Immunität, sondern Reaktionsprodukte des Körpers, die auf infektiöse Körper im Sinne einer Abwehr oder Vernichtung reagieren. Die Bildung der Antikörper und die Heilung der Krankheit sind also aufs engste mit einander verbunden. Um die spezifischen Infektionserreger abzuwehren und zu vernichten bedient sich bei einer Infektion nicht nur der kranke Organismus der Schutzstoffe zur Heilung von Infektionskrankheiten, sondern ebenso der Immune. Behring fand, daß die Schutzstoffe eines immunen Individuums auf Gesunde übertragen werden können und bei diesen den gleichen Zustand der Unempfänglichkeit gegenüber dem spezifischen Infektionserreger, auf den sie eingepaßt sind, hervorrufen.

„Die Körperflüssigkeiten, insbesondere das Blut des geheilten Individuums besitzen die Fähigkeit, andere gesunde Individuen so zu beeinflussen, daß sie auf die Infektion nicht mehr mit Kranksein reagieren, daß sie dadurch also, wie wir sagen „immun" werden. Eben

dasselbe Blut, nachdem es von allen körperlichen Elementen befreit ist, besitzt auch die Fähigkeit, Individuen nach der Infektion mit den in Frage kommenden Infektionsstoffen zu heilen" (v. Behring).

Von Wichtigkeit für die Frage der künstlichen Immunisierung ist aber die Tatsache, daß das Vorhandensein der Schutzstoffe nicht in allen Fällen zur Erklärung der Immunitätsvorgänge ausreicht. Ohne daß es seither bei allen Krankheiten gelungen wäre, spezifische Schutzstoffe mit Sicherheit nachzuweisen, tritt bei verschiedenen Erkrankungen eine echte allgemeine Immunität ein. Andererseits wird auch bei verschiedenen Infektionen beobachtet, daß die Immunität fehlt oder nur gering ist, trotzdem Schutzstoffe in ziemlicher Menge im Körper vorhanden sind. Die Schutzstoffe stellen zwar einen gewissen Gradmesser für die Intensität der Immunitätsreaktionen dar, reichen aber nicht zur Erklärung aller Immunitätsvorgänge aus. Es spielt zweifellos bei einer ganzen Reihe von Fällen neben der Wirkung der gelösten Schutzstoffe des Blutes eine spezifische, biologische Umstimmung, eine Unempfänglichkeit des Gewebes bzw. bestimmter Zellkomplexe für den Infektionsstoff eine sehr bedeutsame Rolle.

Zum Schluß sei noch der Unterschied zwischen passiver und aktiver Immunität klar hervorgehoben. Während bei der passiven Immunisierung die fertigen Antikörper dem Individuum einverleibt werden und dieses dann meist nur kurze Zeit gegen die betreffende Krankheit gefeit ist, werden bei der aktiven Immunisierung die Antigene selbst dem Körper zugeführt und der Körper erarbeitet sich dann durch eigene Antikörperbildung eine meist sehr lange anhaltende Immunität. Die Antigene können lebend, abgeschwächt oder abgetötet sein.

Wie zu Eingang erwähnt wurde, sollte in den vorliegenden Versuchen geprüft werden, ob außer der indirekten Wirksamkeit eines Impfstoffs auch eine direkte durch Versuche in vitro nachgewiesen werden kann.

Von Eisler wurden Versuche angestellt, wobei Staphylokokken, Coli- und Typhusbazillen auf Agarplatten gezüchtet wurden, denen abgetötete Keime der gleichen Art zugesetzt waren. Es zeigte sich, daß die verschiedenen Bakterien bei wechselnden Kombinationen ver-

schieden gedeihen. Außerdem wiesen Piorkowski und Bonnin nach, daß ein aus einem Bakterienstamm „auf übliche Weise" hergestellter Impfstoff in vitro auf einen Bakterienstamm derselben Art (im Brutschrank bei 37 Grad Celsius) bakterizid wirke.

Über das Verhalten von abgetöteten zu lebenden Bakterien der gleichen oder einer andern Art finden sich in der Literatur einige Hinweise. Ich verweise hier auf die Arbeit von Dr. Hanns Schaefer (2).

In Anlehnung an diese Arbeit wurde folgendermaßen verfahren:

Es wurden folgende Bakterienstämme benutzt:

Ein Stamm Bact. Coli C I
„ „ Bact. Coli C II
„ „ Bact. Coli C III
Ein Stamm Staph. aureus S I
„ „ Staph. aureus S II
„ „ Staph. aureus S III

Sämtliche aus der Kulturensammlung des „Hygienischen Instituts Tübingen".

Von jedem dieser Bakterienstämme wurden nach vorherigem Überimpfen auf Schrägagarnährböden und 24 stündiger Bebrütungszeit bei 37 Grad Celsius Impfstoffe hergestellt. Als Aufschwemmungsflüssigkeit für diese Impfstoffe wurde nach Schaefer eine mit 0,85 % NaCl-Lösung verdünnte Nährbouillon (1 : 10) verwandt. Schaefer hatte festgestellt, daß bei Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung in vielen Fällen die Keime bereits nach 24-stündiger Bebrütung abgestorben waren.

In 1 ccm verd. Bouillon wurde eine Öse lebender Keime von 24stünd. Schrägagarkulturen aufgeschwemmt. Die Vaccinen wurden dann durch 2 stünd. Erhitzung im Wasserbad auf 60 Grad Celsius bereitet. Dieser Vorgang mußte bei den 3 Bakt. Coli Stämmen 3 mal, bei den 3 Staph. aur. Stämmen 5 mal nach jedesmaliger Prüfung auf Nährböden und in Nährbouillon auf Sterilität wiederholt werden. Dann erst waren die Impfstoffe steril.

Die Aufschwemmungen der lebenden Keime wurden ebenfalls von Schrägagarkulturen im Alter von 24 Stunden gewonnen. ($^1/_{1000}$ Öse lebender Keime in 1 ccm verd. Bouillon).

Versuchsanordnung.

Die Versuche gliederten sich in 6 Versuchsreihen. Bei jeder dieser Versuchsreihen wurde die Aufschwemmung lebender Keime eines Stamms mit sämtlichen 6 Impfstoffen zusammengebracht, und außerdem das Verhalten der lebenden Aufschwemmung als Kontrolle untersucht. Plattengüsse sofort nach dem Zusammenbringen, nach 4 Stunden und nach 24 Stunden lieferten die Ergebnisse. Für diese Platten kam Gelatine, teilweise auch Agar zur Verwendung. Was im einzelnen benutzt wurde, wird bei der betreffenden Versuchsreihe angegeben werden.

1. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0,2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm. verd. Bouill.
R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,1 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C I + 1,8 ccm verd. Bouill.

Nach 0 Std. und 4 Std. wurden Agarplatten verwandt, nach 24 Std. Gelatineplatten.

2. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0,2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C II + 1,8 ccm verd. Bouill.

Gelatineplatten.

3. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0,2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung C III + 1,8 ccm verd. Bouill.

Gelatineplatten.

4. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0,2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,6 ccm verd. Bouill.

R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S I + 1,8 ccm verd. Bouill.

Gelatineplatten.

5. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeit in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0,2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S II + 1,8 ccm verd. Bouill.

Gelatineplatten.

6. Versuchsreihe.

7 Röhrchen wurden in folgender Weise beschickt (wobei die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2 ccm betrug):

R 1 : 0, 2 ccm Impfstoff C I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 2 : 0,2 ccm Impfstoff C II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III — 1,6 ccm verd. Bouill.
R 3 : 0,2 ccm Impfstoff C III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 4 : 0,2 ccm Impfstoff S I + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 5 : 0,2 ccm Impfstoff S II + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 6 : 0,2 ccm Impfstoff S III + 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,6 ccm verd. Bouill.
R 7 : Proberöhrchen: 0,2 ccm lebende Aufschwemmung S III + 1,8 ccm verd. Bouill.

Nach 0 Std. wurden Gelatineplatten verwandt, nach 4 Std. und 24 Std. Agarplatten.

Bei allen 6 Versuchsreihen wurden von sämtlichen 7 Röhrchen Plattengüsse zur Keimzählung gemacht. Das erste Mal sofort nach Herstellung der Gemische, dann nach 4 Stunden und wieder nach 24 Stunden.

Aus jedem Röhrchen wurde dazu nach sorgfältigem Durchmischen 0,2 ccm entnommen, mit verd. Nährbouillon (1 : 10) 100fach verdünnt und von dieser Verdünnung 0,1 ccm zur Platte gegossen. Die Verdünnung geschah zweizeitig, indem zunächst eine 10fache Verdünnung und hieraus wieder eine 10fache Verdünnung bereitet wurde. Nach den verschiedenen Bebrütungszeiten war es dann möglich, mittels Lupe und Zählplatte die Anzahl der lebenden Keime festzustellen. Die Platten, die sofort nach Herstellung der Gemische gegossen wurden, wurden vollständig ausgezählt, mit Ausnahme der 3 Platten, die 4stellige Keimzahlen aufwiesen. Die von den 4 Stunden alten Gemischen gegossenen Platten wurden so ausgezählt, daß ein Durchschnitt von 4—6 ausgezählten Einzelfeldern gebildet und dieser so gewonnene Wert mit der Zahl 63,64 vervielfacht wurde. Damit war ein Annäherungswert für die auf der gesamten Plattenfläche verteilten Kolonien gewonnen. Die Kolonienzahlen auf den Gußplatten der 24 Stunden alten Gemische haben sich als unzählbar erwiesen. In den Tabellen wurde dies ebenfalls so angegeben.

Ergebnisse der Zählung.

Keimzahl der Platten nach:		0 Std.	4 Std.	24 Std.
1. Versuchsreihe:	R 1	455	19 600	unzählbar
	R 2	318	22 300	„
	R 3	330	12 750	„
	R 4	368	25 100	„
	R 5	376	23 650	„
	R 6	492	19 150	„
	R 7	425	5 200	„
2. Versuchsreihe:	R 1	176	29 150	„
	R 2	132	32 100	„
	R 3	191	16 600	„
	R 4	158	26 900	„
	R 5	108	32 650	„
	R 6	160	34 950	„
	R 7	141	24 550	„

3. Versuchsreihe:	R 1	531	31 500	unzählbar
	R 2	214	32 300	„
	R 3	388	20 800	„
	R 4	328	18 500	„
	R 5	396	25 900	„
	R 6	218	23 700	„
	R 7	479	31 950	„
Keimzahl der Platten nach:		0 Std.	4 Std.	24 Std.
4. Versuchsreihe:	R 1	159	900	unzählbar
	R 2	191	1 100	„
	R 3	206	2 550	„
	R 4	343	3 250	„
	R 5	205	2 400	„
	R 6	176	1 700	„
	R 7	188	950	„
5. Versuchsreihe:	R 1	1 500	7 300	„
	R 2	16	3 150	„
	R 3	2 300	4 800	„
	R 4	161	1 500	„
	R 5	15	1 650	„
	R 6	42	4 600	„
	R 7	26	1 700	„
		0 Std.	2 Std.	18 Std.
6. Versuchsreihe:	R 1	1 500	12 000	unzählbar
	R 2	111	764	„
	R 3	537	7 500	„
	R 4	964	5 200	„
	R 5	164	423	„
	R 6	157	312	„
	R 7	154	178	„

Anm. Die Keimzahlen der mit den 4 Stunden alten Gemischen gegossenen Platten wurden, soweit sie dreistellig waren, vollständig ausgezählt. Außerdem muß bemerkt werden, daß die vier- und fünfstelligen Keimzahlen auf volle 50 auf- bzw. abgerundet sind. Da es sich nur um Annäherungswerte handelt, dürfte dies berechtigt sein.

Bei sämtlichen Versuchen hat sich gezeigt, daß durch die Anwesenheit der Impfstoffe keinerlei Hemmung der Vermehrungsfähigkeit der lebenden Keime zu beobachten war. Um eine solche etwa nach anderen Bebrütungszeiten (statt nach 4 und 24 Stunden nach 2 und 18 Stunden) feststellen zu können, wurden die Versuche der 6. Versuchsreihe nach 2 und 18 Stunden vorgenommen. Auch bei dieser Anordnung war lediglich eine starke Vermehrung der lebenden Keime zu beobachten.

Zusammenfassung.

Es wurden lebende Staphylokokken- und Colibakterienaufschwemmungen in verdünnter Nährbouillon mit verschiedenartigen abgetöteten Bakterien (Impfstoffen) in eben dieser Nährbouillon zusammengebracht. Es wurden Zählplatten gegossen, und zwar sofort nach Herstellung der Gemische und nach verschieden langen Bebrütungszeiten derselben. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde verglichen mit der Anzahl der auf den zu gleicher Zeit hergestellten Kontrollplatten gewachsenen Kolonien. Dabei konnten Einwirkungen der Impfstoffe auf die lebenden Keime nicht festgestellt werden.

Zum Schluß erlaube ich mir, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W o l f, Vorstand des Hygienischen Instituts in Tübingen, für die Anregung zu dieser Arbeit und das rege Interesse an ihr meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Ebenso erlaube ich mir, Herrn Privatdozent Dr. S a l e c k für die tatkräftige Förderung meiner Arbeit an dieser Stelle bestens zu danken.

Literatur.

(1) Handbuch der pathologenen Mikroorganismen von W, Kolle, R. Kraus, P. Uhlenhut. Bd. I, 1.

(2) Centralblatt für Bakteriologie 118 Originale 1930.

Lebenslauf.

Als Sohn des verstorbenen Steueramtmanns Emil Müller und seiner Ehefrau Emilie Müller geb. Maier wurde ich am 14. August 1909 in Stuttgart geboren. Vom Herbst 1915 bis Herbst 1917 besuchte ich die Elementarschule in Stuttgart. Dann trat ich in die Vorklasse des Stuttgarter Dillmann-Realgymnasiums im Herbst 1917 ein und bestand an dieser Anstalt im Frühjahr 1927 die Reifeprüfung. Vom Frühjahr 1927 bis Herbst 1931 studierte ich in Tübingen, wo ich nach 4 Semestern die zahnärztliche Vorprüfung und nach weiteren 3 Semestern die zahnärztliche Prüfung bestand.